

USO DE LA VINPOCETINA PARA PREVENIR LAS COMPLICACIONES, PARTICULARMENTE LAS RELACIONADAS CON LA AUDICIÓN, QUE ACOMPAÑAN A LA EPILEPSIA Y SU TRATAMIENTO.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el uso de la vinpocetina y los derivados de la misma que puedan desarrollarse y que mantengan los mismos efectos para el tratamiento de la epilepsia y sus complicaciones, particularmente las relacionadas con la vía auditiva.

10

ANTECEDENTES

Uno de los principales problemas de la epilepsia es el deterioro de las funciones cognitivas que causan la enfermedad (Prevey et al. 1998 *Epilepsy Res.* 30: 1; Theodore et al. 1999 *Neurology* 52: 132; Meador 2001 *Epilepsy Behav.* 2: 307) y su tratamiento con las drogas antiepilépticas disponibles (Gates 2000 *Epilepsy Behav.* 1: 153; Kwan y Brodie 2001 *Lancet* 357: 216; Brunbech y Sabers 2002 *Drugs* 62: 593; Schmidt 2002 *Epilepsy Res.* 50: 21).

La implicación de las estructuras del tallo cerebral en la patofisiología de la epilepsia generalizada se evidencia por las alteraciones en las latencias y/o las amplitudes de las ondas tardías de la respuesta auditiva del tallo cerebral (RATC) que se observan en los pacientes con epilepsia generalizada (Rodin et al. 1982 *Clin. Electroencephalogr.* 13: 154; Mervaala et al. 1986 *Epilepsia* 27: 542; Phillips et al. 1990 *Clin. Electroencephalogr.* 21: 135; Soliman et al. 1993 *Ear Hear* 14: 235; Kohsaka et al. 1999 *Brain Res.* 837: 277; Kohsaka et al. 2001 *Brain Res.* 903: 53). La epilepsia aguda inducida por agentes convulsivos en animales no medicados también se ve acompañada por anomalías en las ondas tardías de la RATC y por una marcada pérdida del oído (Nekrassov y Sitges 2003 *Epilepsy Res.* 53: 245).

Las RATC son potenciales evocados constituidos por varias ondas que se presentan dentro de los 10 primeros milisegundos después de un estímulo auditivo. Como los cambios en las ondas tardías de las RATC indican alteraciones de núcleos específicos del tallo cerebral auditivo (Hughes y Fino

1985 *J. Clin. Neurophysiol.* 2: 355), las RATC se usan comúnmente en el diagnóstico clínico de lesiones retro-cocleares. Además, el umbral de las RATC se usa en el diagnóstico clínico de la sensibilidad auditiva, pues a medida que la sensibilidad auditiva disminuye se requieren estímulos de intensidad progresivamente mas elevada para producir la RATC. El aumento del umbral de la RATC representa una medida objetiva del deterioro de la audición.

Las drogas antiepilépticas, incluyendo a la carbamazepina, valproato, fenitoína, fenobarbital, clonazepam y vigabatrina, también causan alteraciones en las ondas de la RATC así como deficiencias en la audición (Mervaala et al. 1987 *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 68: 475; Armon et al. 1990 *Neurology* 40: 1896; Hirose et al. 1990 *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 75: 543; Yuksel et al. 1995 *Childs Nerv. Syst.* 11: 474; De la Cruz y Bance 1999 *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 125: 225; Zgorzalewicz y Galas-Zgorzalewicz 2000 *Clin. Neurophysiol.* 111:2150).

La vinpocetina (etil apovincamina-22-oato) descubierta al final de los 1960s ha sido exitosamente utilizada en el tratamiento de desórdenes del sistema nervioso central de origen cerebrovascular. En modelos animales de hipoxia e isquemia la vinpocetina ejerce efectos benéficos contra el daño neuronal (King 1987 *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 286:299; Araki et al. 1990 *Res..Exp..Med.* 190:19).

Más recientemente la vinpocetina también ha sido utilizada para mejorar la memoria con base en estudios previos en animales y humanos (Subhan and Hindmarch 1985 *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 28: 567; Bhatti and Hindmarch 1987 *Int. Clin. Psychopharmacol.* 2: 325; DeNoble 1987 *Pharmacol. Biochem. Behav.* 26: 183).

La vinpocetina es un bloqueador de los canales de Na⁺ (Erdő et al. 1996 *Europ. J. Pharmacol.* 314:69). En terminales nerviosas cerebrales aisladas nosotros hemos demostrado que la vinpocetina inhibe selectivamente la liberación de neurotransmisores inducida por un aumento en la permeabilidad de los canales presinápticos de Na⁺ (Sitges and Nekrassov, 1999 *Neurochem. Res.* 24:1587; Trejo et al. 2001 *Brain Res.* 909:59). Además encontramos que en el cobayo en vivo la vinpocetina ejerce una inhibición a largo plazo de las

alteraciones de las ondas de la RATC, la pérdida del oído y la mortalidad que induce la amikacina (Nekrassov and Sitges 2000 *Brain Res.* 868: 222) así como otros antibióticos aminoglicósidos, tales como la neomicina y la gentamicina (resultados no publicados).

- 5 Existe una necesidad médica no cubierta para tratar las epilepsias. La medicación con las drogas antiepilépticas tanto de la vieja como de la nueva generación, aunque ejerce un efecto positivo en el control de las convulsiones (cuando menos en aproximadamente el 70% de los pacientes epilépticos), causa un deterioro de las funciones cognitivas (Vermeulen y Aldenkamp 1995
- 10 *Epilepsy Res.* 22: 65; Gates 2000 *Epilepsy Behav.* 1: 153; Brunbech y Sabers 2002 *Drugs* 62: 593; Schmidt 2002 *Epilepsy Res.* 50: 21), que debe agravar el deterioro en la cognición que causa la propia enfermedad (Prevey et al. 1998 *Epilepsy Res.* 30: 1; Jokeit y Ebner 1999 *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 67: 44; Theodore et al. 1999 *Neurology* 52: 132; Meador 2001 *Epilepsy Behav.* 2:
- 15 307). Las drogas antiepilépticas también causan alteraciones en las ondas de la RATC (Mervaala et al. 1987 *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 68: 475; Armon et al. 1990 *Neurology* 40: 1896; Hirose et al. 1990 *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 75: 543; Yuksel et al. 1995 *Childs Nerv. Syst.* 11: 474; De la Cruz y Bance 1999 *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 125: 225; Zgorzalewicz y Galas-Zgorzalewicz 2000 *Clin. Neurophysiol.* 111:2150), que pueden resultar en la pérdida del oído (Nekrassov y Sitges 2003 *Epilepsy Res.* 53: 245); y no producen un impacto perceptible en la profilaxis de la enfermedad después del primer ataque convulsivo (Hernandez 1997 *Trends Pharmacol. Sci.* 18: 59; Temkin et al. 2001 *Drugs* 61: 1045; Schmidt 2002 *Epilepsy Res.* 50: 21).

- 25 Las drogas antiepilépticas disponibles provocan varios efectos secundarios adversos que en muchas ocasiones llevan a los pacientes a parar el tratamiento debido a alteraciones importantes que limitan su vida diaria.

- La presente invención se refiere al uso de la vinpocetina y los derivados de la misma que puedan desarrollarse y que mantengan los mismos efectos para
- 30 preparar un medicamento útil en el tratamiento de las epilepsias y sus complicaciones. La presente invención describe la acción benéfica de la vinpocetina en la prevención de la actividad cortical epiléptica durante los

periodos ictal y post-ictal, así como en la prevención de algunos de los disturbios más importantes que causa la enfermedad y que agravan las drogas antiepilépticas disponibles.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. La figura muestra los registros de las RATC que se tomaron en un animal representativo antes (a) y 50 min después de la inyección del agente convulsivo pentilentetrazol (PTZ) en un animal inyectado con vehículo 4 horas antes del PTZ (b) y en un animal inyectado con vinpocetina 4 horas antes del PTZ (c). El animal recibió un estímulo monoaural (indicado por la flecha) de 100 decibeles (dB) a una frecuencia de 8 kilo-hertz (kHz) de tono puro.

Figura 2. La figura muestra que la vinpocetina inhibe el aumento en las latencias de las ondas P2, P3 y P4 de la RATC que induce el PTZ. Las latencias de las ondas inducidas por estímulos de 100 dB a frecuencias de 8 kHz (gráficas de la izquierda) y de 4 kHz (gráficas de la derecha) se determinaron antes (Ant.) y 10, 20, 30 y 50 min después de la inyección del PTZ en animales control pre-inyectados con vehículo (círculos negros) y en animales pre-inyectados con 2mg/kg de vinpocetina (círculos vacíos). Los resultados son el promedio \pm error de 8 animales independientes.

Figura 3. La figura muestra que la vinpocetina inhibe los cambios en el electroencefalograma (EEG) que induce el PTZ durante el periodo ictal. Los registros de EEG que se muestran se tomaron en un animal representativo antes (trazo superior) y aproximadamente 2 min después de la inyección del PTZ en el animal pre-inyectado con vehículo 4 horas antes del PTZ (trazo en el centro) ó pre-inyectado con vinpocetina 4 horas antes del PTZ (trazo de abajo).

Figura 4. La figura muestra que la vinpocetina inhibe los cambios en el EEG que induce el PTZ durante el periodo post-ictal. Los registros de EEG que se muestran en (a) se tomaron en un animal representativo pre-inyectado con vehículo antes (trazo superior) y 10, 20, 30 y 50 min después de la inyección del PTZ. Los registros de EEG que se muestran en (b) se tomaron en un animal representativo pre-inyectado con vinpocetina antes (trazo superior) y 10, 20, 30 y 50 min después de la inyección del PTZ.

Figura 5. La figura muestra que la vinpocetina inhibe las alteraciones en la amplitud de las ondas tardías de la RATC que induce otro agente convulsivo, la 4-aminopiridina (4-AP). Las RATC fueron inducidas por un estímulo de 100 dB a 8 kHz. Se muestra que el aumento progresivo en la amplitud de la onda P3 de la RATC que se observa después de la inyección de 4-AP en los animales control (a), se elimina en los animales tratados con vinpocetina (b), y que la marcada disminución en la amplitud de la onda P4 de la RATC que se observa en los animales control después de la inyección de 4-AP (c) se reduce considerablemente en los animales que recibieron vinpocetina (d).

Figura 6. La figura muestra que la vinpocetina inhibe los cambios en el EEG que induce la 4-AP durante el periodo ictal. Los registros de EEG que se muestran en (a) se tomaron en un animal representativo antes y aproximadamente 20 min después de la inyección de la 4-AP en el animal pre-inyectado con vehículo. Los registros de EEG que se muestran en (b) se tomaron en un animal representativo antes y aproximadamente 20 min después de la inyección de la 4-AP en el animal pre-inyectado con 2mg/kg de vinpocetina.

Figura 7. La figura muestra que la vinpocetina inhibe los cambios en el EEG que induce la 4-AP durante el periodo post-ictal. Los registros de EEG que se muestran en (a) se tomaron en un animal representativo pre-inyectado con vehículo antes (trazo superior) y 30, 60 y 80 min después de la inyección de la 4-AP. Los registros de EEG que se muestran en (b) se tomaron en un animal representativo pre-inyectado con vinpocetina antes (trazo superior) y 30, 60 y 80 min después de la inyección de la 4-AP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un trabajo previo demostramos que las alteraciones de la actividad de los núcleos lateral y medial del complejo olivar superior reflejadas en anomalías en los parámetros de amplitud y latencia de las ondas tardías de la RATC están ligadas a la pérdida del oído causada por la epilepsia (Nekrassov y Sitges 2003 *Epilepsy Res.* 53: 245).

La presente invención demuestra que la vinpocetina inhibe las alteraciones de amplitud y latencia en las ondas de la RATC, así como la pérdida del oído y la actividad epiléptica cortical característica que se observa en animales sometidos a dos modelos de epilepsia experimental en vivo.

5 La epilepsia puede ser inducida en animales experimentales en vivo mediante la disminución de la transmisión cerebral inhibitoria o mediante el aumento de la transmisión cerebral excitadora. Esto se consigue inyectando al antagonista GABAérgico PTZ o aumentando la liberación de glutamato con 4-AP, respectivamente. Nuestros resultados en cobayos muestran que cuando la
10 vinpocetina se administra a una concentración de 2 mg/kg i.p., 4 horas antes de la inyección de PTZ ó una hora antes de la inyección de 4-AP, ninguno de los dos agentes convulsivos es capaz de alterar la amplitud y/ó la latencia de las ondas tardías de la RATC, de provocar pérdida del oído ó de inducir la actividad epiléptica cortical.

15 En el cobayo las ondas P3 y P4 de la RATC expresan la actividad de los núcleos medial y lateral de la oliva superior, respectivamente (Wada y Starr 1983 *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 56: 326; 56: 340; 56: 352). Entre los núcleos de la oliva superior el generador de la onda P4 es determinante para la localización del sonido (Tollin 2003 *Neuroscientist* 9: 127). Los cambios
20 en las ondas tardías de la RATC indican alteraciones retro-cocleares. La vinpocetina cancela todas las anomalías retro-cocleares inducidas por el PTZ y la 4-AP (evidenciadas por los cambios en los parámetros de las ondas P3 y P4) y por este medio previene de la pérdida del oído que inducen ambos agentes convulsivos.

25 Las drogas antiepilépticas disponibles inducen alteraciones en los parámetros de las ondas de la RATC y deficiencias en la audición que deben agravar las inducidas por la propia enfermedad. La medicación con las drogas antiepilépticas aunque ejerce efectos positivos en el control de las convulsiones también causa efectos secundarios adversos, entre los cuales la declinación en
30 las funciones cognitivas y la pérdida del oído son particularmente importantes. La vinpocetina es bien tolerada y no presenta contraindicaciones en el humano a dosis elevadas de 60 mg por día (Hindmarch et al. 1991 *Int. Clin.*

Psychopharmacol. 6: 31). Nuestros resultados indican que la vinpocetina a una dosis razonable (2mg/kg) completamente cancela la actividad epiléptica cortical inducida por el PTZ y la 4-AP durante los periodos ictal y post-ictal, así como la pérdida del oído inducida por los agentes convulsivos. La contribución de la pérdida del oído sobre la cognición que producen tanto la epilepsia como las drogas antiepilépticas clásicas es prevenida por la vinpocetina, lo que indica la ventaja que representa el uso de la vinpocetina como antiepiléptico sobre los tratamientos con los antiepilépticos clásicos.

Otro problema de las drogas antiepilépticas disponibles es que no tienen un impacto perceptible sobre la epileptogénesis o el desarrollo de la enfermedad. En un estudio previo nosotros demostramos que la vinpocetina ejerce un efecto protector prolongado (más de medio año) sobre los cambios en las ondas de la RATC, la pérdida del oído y la mortalidad que induce el tratamiento con una dosis alta de amikacina (Nekrassov y Sitges 2000 *Brain Res.* 868: 222), lo que sugiere que la vinpocetina también debe tener una acción profiláctica importante en el tratamiento de la epilepsia.

En resumen, nuestros hallazgos indican que la vinpocetina previene la actividad epiléptica cortical durante los periodos ictal y post-ictal, así como las alteraciones en las ondas de la RATC que resultan en la pérdida del oído y contribuyen a los efectos adversos que causan tanto la epilepsia como las drogas antiepilépticas disponibles sobre las funciones cognitivas. Estos hallazgos junto con la acción protectora de la vinpocetina a largo plazo indican que la vinpocetina es una mejor alternativa en el tratamiento y profilaxis de las epilepsias.

25

EJEMPLOS

Se realizaron experimentos en cobayos pigmentados adultos machos (349 ± 38 g de peso inicial) con umbrales auditivos similares. Los registros de la RATC se utilizaron para evaluar el estado auditivo en cada animal y los registros de EEG para evaluar los cambios en la excitabilidad cortical. El método detallado que seguimos para la obtención de dichos registros está reportado en nuestro estudio previo (Nekrassov y Sitges 2003 *Epilepsy Res.*

30

53:245). Los procedimientos experimentales no violan las normas del Comité Institucional de Uso y Cuidado de los animales.

Se practicaron 3 tipos de registros en los animales anestesiados. A saber, los registros de las RATC inducidas por un estímulo de alta intensidad (100 dB), los registros de la RATC para determinar el umbral auditivo y los registros de EEG.

Determinación de los parámetros de las ondas del RATC. Las latencias y amplitudes de cada onda de la RATC inducida por el estímulo de 100 dB a frecuencias de tonos puros de 8 y 4 kHz se midieron en todas las RATC obtenidas a tiempos específicos en las diferentes condiciones experimentales. La latencia de cada onda en milisegundos (ms) se refiere al intervalo de tiempo entre el inicio del estímulo auditivo y el pico positivo de la onda. El inicio del estímulo está indicado por la flecha debajo de los registros que se muestran en la figura 1. La amplitud al pico de cada onda se mide en microvoltios (μV) y es la diferencia entre el pico positivo y la línea base (trazo entre el estímulo y la aparición de la primera onda de la RATC en la Fig. 1).

Para determinar el umbral auditivo se registraron las RATC inducidas por estímulos de intensidades en decibeles (dB) progresivamente menores. El umbral auditivo se define como la intensidad de estímulo más baja que permite registrar la onda P3 de la RATC en tres intentos consecutivos.

Para evaluar las diferencias entre los resultados obtenidos antes y a tiempos específicos después de la inyección de los agentes convulsivos, se empleó la prueba estadística *t* de Student. El criterio de significancia estadística adoptado fue de $P \leq 0.05$. Los datos están expresados como la media \pm error estándar. En las figuras y tablas se utiliza un asterisco para indicar diferencias estadísticamente significativas.

Ejemplo 1. Diseño experimental para probar el efecto de la vinpocetina sobre los cambios en la RATC y el EEG que induce la epilepsia resultante de una reducción en la transmisión cerebral inhibitoria.

Ocho cobayos machos se incluyeron en este estudio. El PTZ se disolvió en salina y la vinpocetina en salina acidificada (con HCl) ajustada a pH 4 (con

NaOH). Cuatro horas después de inyectar a los cobayos con vehículo (salina acidificada que se usó para disolver la vinpocetina), los animales se anestesiaron y se tomó una primera serie de registros de la RATC y el EEG antes de inyectar al agente convulsivo, PTZ intraperitonealmente (i.p.). Los animales se inyectaron con 100 mg/kg de PTZ y aproximadamente a los 2 min después de haber inyectado el PTZ (periodo ictal) se registró el EEG, luego se tomaron otras series de registros de RATC y EEG a tiempos específicos (dentro del periodo-post-ictal). Después de un par de semanas se repitió la misma serie de tomas de registros pero en vez del vehículo los animales se inyectaron con 2 mg/kg de vinpocetina 4 horas antes de inyectar el PTZ.

La siguiente tabla muestra que la vinpocetina inhibe la reducción en la amplitud de la onda P4 de la RATC que provoca el PTZ. En los animales control (pre-inyectados con vehículo) la amplitud de la onda P4 inducida por el estímulo de 100 dB a 2 frecuencias (8 y 4 kHz) se reduce progresivamente después de la inyección del PTZ (columnas de la izquierda), mientras que en los animales pre-inyectados con vinpocetina la reducción que produce el PTZ en la amplitud de P4 no se observa (columnas de la derecha). Los valores que se muestran en la tabla representan el promedio \pm error estándar de las amplitudes en μ V de la onda P4 obtenidas en 8 animales antes y a los tiempos indicados después de la inyección del agente convulsivo (PTZ).

	8 kHz PTZ	8 kHz Vinpocetina + PTZ
<i>Antes</i>	2.88 ± 0.1	2.69 ± 0.1
<i>10 min</i>	$2.07 \pm 0.4^*$	2.56 ± 0.1
<i>20 min</i>	$1.99 \pm 0.3^*$	2.71 ± 0.2
<i>30 min</i>	$1.92 \pm 0.3^*$	2.55 ± 0.2
<i>50 min</i>	$1.51 \pm 0.5^*$	2.56 ± 0.1
	4 kHz	4 kHz

	PTZ	Vinpocetina + PTZ
<i>Antes</i>	3.14 ± 0.1	2.82 ± 0.3
<i>10 min</i>	$1.70 \pm 0.5^*$	2.55 ± 0.3
<i>20 min</i>	$2.12 \pm 0.4^*$	2.52 ± 0.2
<i>30 min</i>	$1.84 \pm 0.4^*$	2.55 ± 0.2
<i>50 min</i>	$2.11 \pm 0.3^*$	2.52 ± 0.2

La vinpocetina también inhibe el aumento que se produce tras la inyección del PTZ en las latencias de las ondas P2, P3 y P4 de la RATC inducida por el estímulo de 100 dB a las frecuencias 8 y 4 kHz. (Fig. 2).

La siguiente tabla muestra que la vinpocetina inhibe la pérdida del oído que induce el agente convulsivo, PTZ. El aumento pronunciado del umbral auditivo que produce el PTZ a las frecuencias de 8 y 4 kHz (columnas de la izquierda) no se produce en los animales pre-inyectados con vinpocetina antes de la administración del PTZ (columnas de la derecha). Los valores que se muestran en la tabla son el promedio \pm error de los umbrales en dB obtenidos en 8 animales.

	PTZ	Vinpocetina + PTZ
8 kHz		
<i>Antes</i>	7.0 ± 1.2	6.0 ± 1.0
<i>30 min</i>	$17 \pm 2.0^*$	6.0 ± 1.0
<i>50 min</i>	$21 \pm 2.4^*$	6.0 ± 1.0
4 kHz		
<i>Antes</i>	21 ± 1.0	20 ± 1.6

30 min	$28 \pm 2.0^*$	18 ± 1.2
50 min	$29 \pm 1.0^*$	18 ± 1.2

La vinpocetina inhibe todos los cambios que induce el PTZ en el EEG. Todos los animales anestesiados inyectados con PTZ desarrollaron convulsiones generalizadas, caracterizadas por espigas repetitivas agudas de elevada amplitud en el EEG que aparecen repentinamente en los primeros 2 min después de la inyección del PTZ. Este cambio dramático en la actividad cortical que induce el PTZ en los animales anestesiados durante las convulsiones es seguido por un patrón típico de actividad cortical caracterizado por salvas de espigas rítmicas de alta amplitud. El tiempo de duración de este patrón típico de actividad cortical que

no se acompaña de convulsiones se denomina periodo post-ictal.

La vinpocetina inhibe completamente la aparición de la actividad cortical que induce el PTZ durante los periodos ictal y post-ictal. En los trazos superiores de las Figs. 3 y 4 se muestran registros característicos del EEG en condiciones control (i.e. antes de la inyección del PTZ). Los cambios dramáticos en el EEG que induce el PTZ aproximadamente después de 2 min en los animales pre-inyectados con vehículo, no se producen cuando se inyecta el PTZ en los animales que fueron pre-inyectados con vinpocetina (ver Fig. 3). Asimismo los cambios que produce el PTZ a los 10, 20, 30 y 50 minutos después de su inyección (Fig. 4a) no se producen en los animales pre-inyectados con vinpocetina (Fig. 4b).

Ejemplo 2. Diseño experimental para probar el efecto de la vinpocetina sobre los cambios en los registros de RATC y EEG que induce la epilepsia resultante de un incremento en la transmisión cerebral excitadora.

En este estudio se incluyeron 5 cobayos machos. Una hora después de inyectar a los cobayos con vehículo (salina acidificada que se usa para disolver la vinpocetina), los animales se anestesiaron y se tomó una primera serie de

registros de RATC y EEG antes de inyectar el agente convulsivo, 4-AP i.p. Los animales se inyectaron con 2 mg/kg de 4-AP y aproximadamente a los 20 min después de haber inyectado la 4-AP (periodo ictal) se registró el EEG, luego se tomaron otras series de registros de RATC y EEG a tiempos específicos (dentro del periodo-post-ictal). Después de un par de semanas se repitió la misma serie de tomas de registros pero en vez del vehículo los animales se inyectaron con 2 mg/kg de vinpocetina 1 hora antes de inyectar la 4-AP.

La vinpocetina también inhibe los cambios en las amplitudes de las ondas P3 y P4 que produce la 4-AP. Por ejemplo, el aumento progresivo en la amplitud de la onda P3 que produce la 4-AP en los animales control (Fig. 5a) se elimina en los animales tratados con vinpocetina (Fig. 5b) y la disminución en la amplitud de la onda P4 que produce la 4-AP en los animales control (Fig. 5c) se reduce notoriamente en los animales tratados con vinpocetina (Fig. 5d).

En la siguiente tabla se muestra que los aumentos en la latencia de la onda P4 de la RATC inducida por el estímulo de 100 dB a las frecuencias de 8 y 4 kHz que se observan a los tiempos indicados después de la inyección de 4-AP en los animales control (columnas a la izquierda), no se producen cuando la 4-AP se inyecta en los animales pre-tratados con vinpocetina (columnas a la derecha).

	8 kHz 4-AP	8 kHz Vinpocetina + 4-AP
<i>Antes</i>	3.48 ± 0.06	3.48 ± 0.04
<i>30 min</i>	3.51 ± 0.13	3.55 ± 0.07
<i>60 min</i>	$3.80 \pm 0.10^*$	3.45 ± 0.08
<i>80 min</i>	$3.80 \pm 0.10^*$	3.36 ± 0.05
<i>100 min</i>	$3.83 \pm 0.12^*$	3.35 ± 0.07
	4 kHz 4-AP	4 kHz Vinpocetina + 4-AP

13

<i>Antes</i>	3.50 ± 0.02	3.45 ± 0.06
<i>30 min</i>	$3.78 \pm 0.09^*$	3.37 ± 0.06
<i>60 min</i>	$3.78 \pm 0.09^*$	3.54 ± 0.11
<i>80 min</i>	$3.78 \pm 0.09^*$	3.56 ± 0.04
<i>100 min</i>	$3.75 \pm 0.10^*$	3.43 ± 0.09

En la siguiente tabla se muestra que el aumento en el umbral auditivo que induce la 4-AP a las frecuencias de 8 y 4 kHz en los animales control (columnas a la izquierda), no se produce en los animales tratados con vinpocetina (columnas a la derecha).

	4-AP	Vinpocetina + 4-AP
8 kHz		
<i>Antes</i>	3.8 ± 1.3	2.5 ± 1.4
<i>30 min</i>	$10.0 \pm 2.0^*$	-1.3 ± 2.4
<i>60 min</i>	$23.8 \pm 6.3^*$	0.0 ± 3.5
4 kHz		
<i>Antes</i>	13.8 ± 1.3	13.8 ± 1.3
<i>30 min</i>	$20 \pm 2.0^*$	11.3 ± 1.3
<i>60 min</i>	$30 \pm 3.5^*$	11.3 ± 1.3

La vinpocetina inhibe todos los cambios que induce la 4-AP en el EEG. Todos los animales inyectados con 4-AP desarrollaron convulsiones generalizadas, caracterizadas por espigas repetitivas agudas de elevada amplitud en el EEG que aparecen aproximadamente 20 min después de la inyección de la 4-AP. Este cambio en la actividad cortical que induce la 4-AP durante el periodo ictal es seguido por el periodo post-ictal caracterizado por espigas aisladas de alta amplitud que aparecen en el EEG aproximadamente una hora después de la inyección de la 4-AP. La vinpocetina inhibe completamente la aparición de la actividad cortical que induce la 4-AP durante los periodos ictal y post-ictal.

En los trazos superiores de la figura 6 se muestran registros característicos de EEG tomados antes de inyectar la 4-AP en los animales pre-inyectados con vehículo (a) y en los animales pre-inyectados con vinpocetina (b). Los cambios que induce la 4-AP sobre el EEG durante el periodo ictal se muestran en el segundo trazo de la figura 6a. En los animales tratados con vinpocetina la 4-AP es incapaz de inducir la actividad ictal (segundo trazo en la Fig. 6b). En la figura 7a se muestra la actividad post-ictal que induce la 4-AP, misma que también se pierde cuando el agente convulsivo (4-AP) se inyecta en los animales pre-tratados con vinpocetina (Fig. 7b).

REIVINDICACIONES

Habiendo descrito de manera suficiente y clara nuestra invención, consideramos como una novedad y por consiguiente reclamamos como de nuestra exclusiva propiedad lo contenido en las siguientes cláusulas:

5

1. Uso de la vinpocetina ó sus derivados para la fabricación de un medicamento útil en el tratamiento y la profilaxis de enfermedades neurológicas, preferentemente la epilepsia y capaz de antagonizar las alteraciones en las ondas de la respuesta auditiva del tallo cerebral (RATC) y la
10 pérdida del oído que acompañan a la enfermedad.

2. Uso de acuerdo a la reivindicación 1, de la vinpocetina (ó sus derivados) para el tratamiento de alteraciones de origen retro-coclear, caracterizado porque inhibe las alteraciones de amplitud y latencia de las diferentes ondas de
15 la RATC.

3. Uso de acuerdo a la reivindicación 1, de la vinpocetina (ó sus derivados) para el tratamiento de la pérdida del oído, caracterizado porque inhibe el aumento en el umbral auditivo inducido por agentes químicos diversos, tales
20 como el pentilentetrazol, la 4-aminopiridina y los antibióticos aminoglicósidos.

4. Uso de acuerdo a la reivindicación 1, de la vinpocetina (ó sus derivados) como antiepiléptico caracterizado porque inhibe la actividad epiléptica cortical durante los periodos ictal y post-ictal.

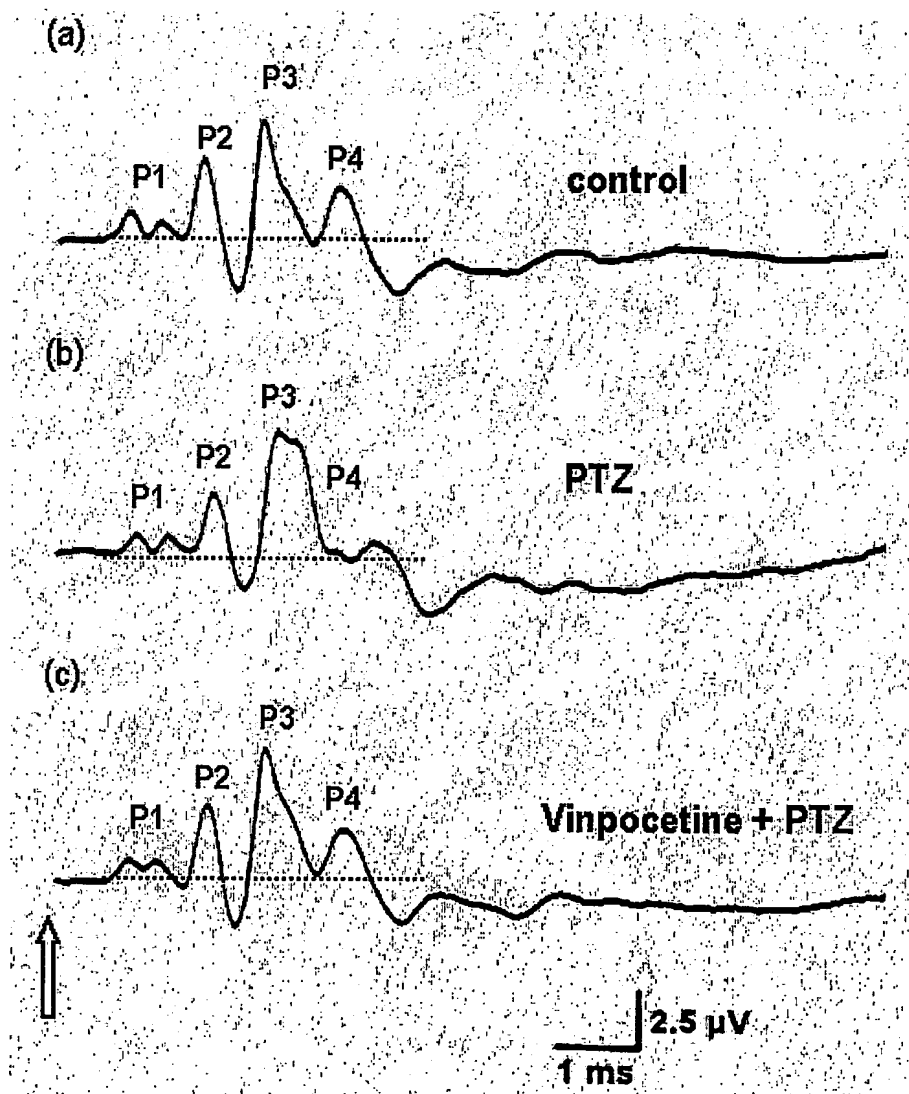
25

5. Uso de acuerdo a la reivindicación 1, de la vinpocetina (ó sus derivados) en la profilaxis de enfermedades neurológicas, preferentemente la epilepsia, caracterizado porque ejerce acción protectora a largo plazo sobre las alteraciones de las ondas de la RATC inducidas por antibióticos
30 aminoglicósidos.

6. Uso del medicamento de la reivindicación 1-5, caracterizado porque puede ser administrable oral o parenteralmente en un vehículo farmacéuticamente aceptado.

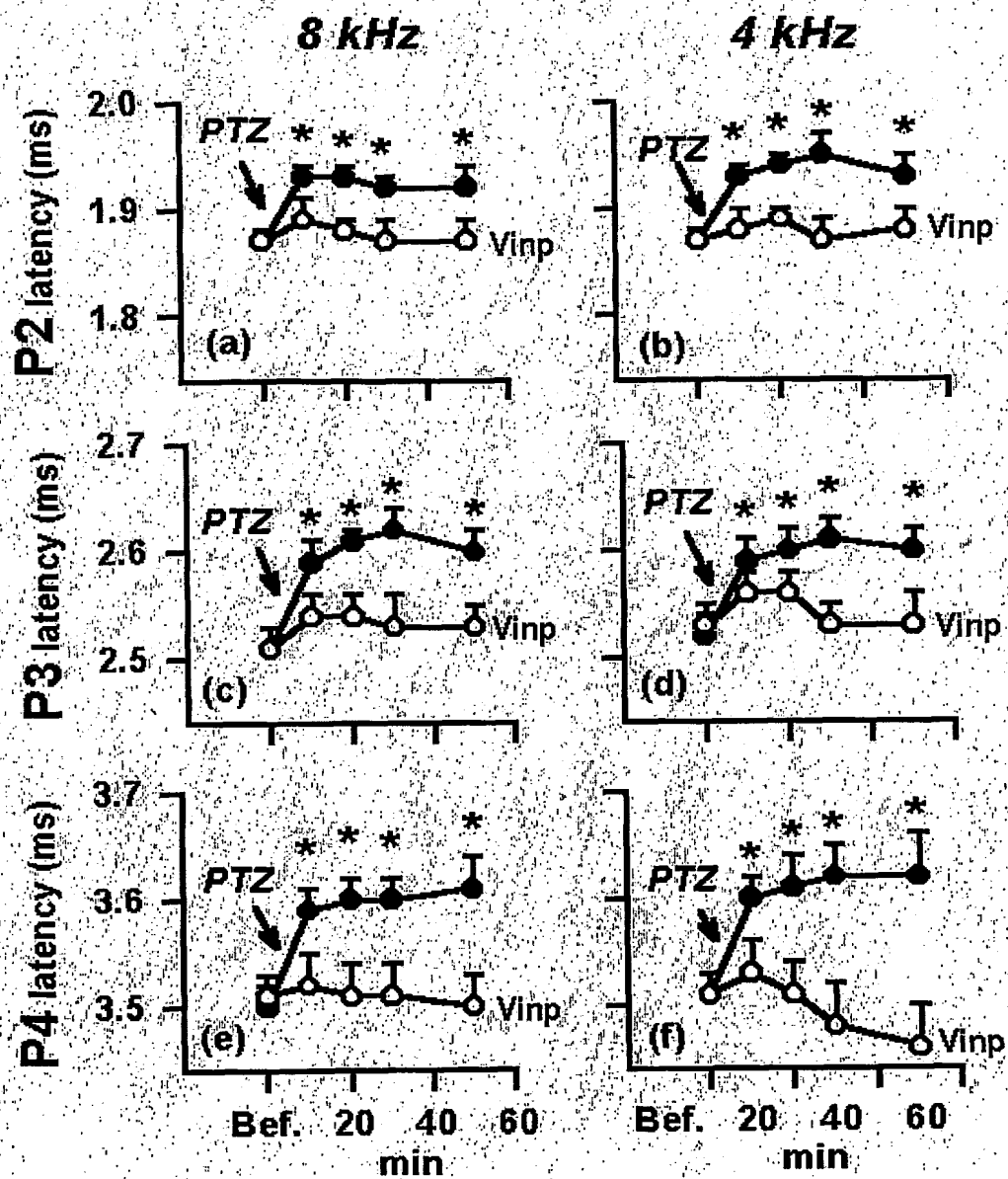
1/7

Figure 1



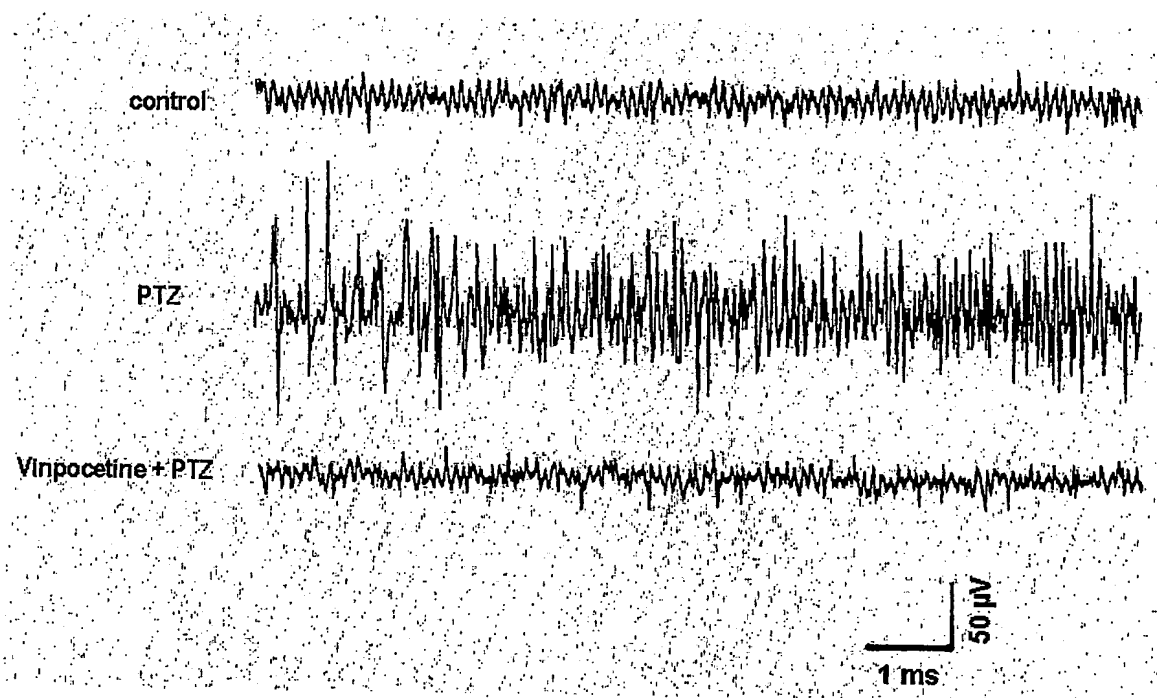
2/7

Figure 2



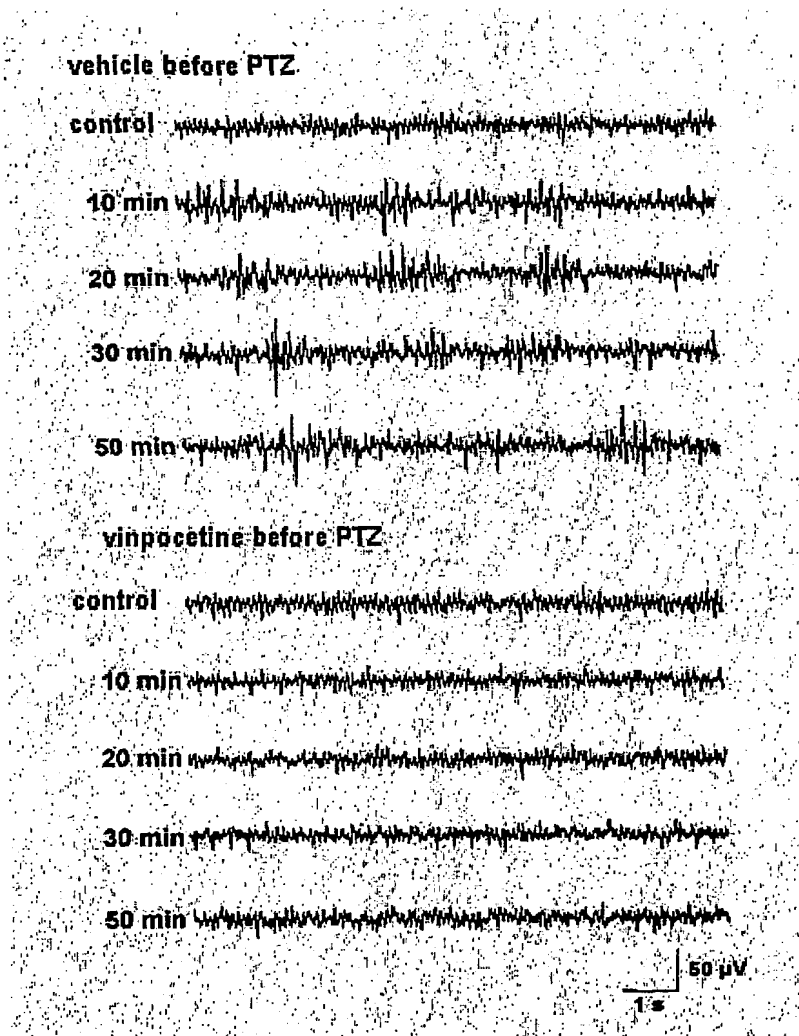
3/7

Figure 3



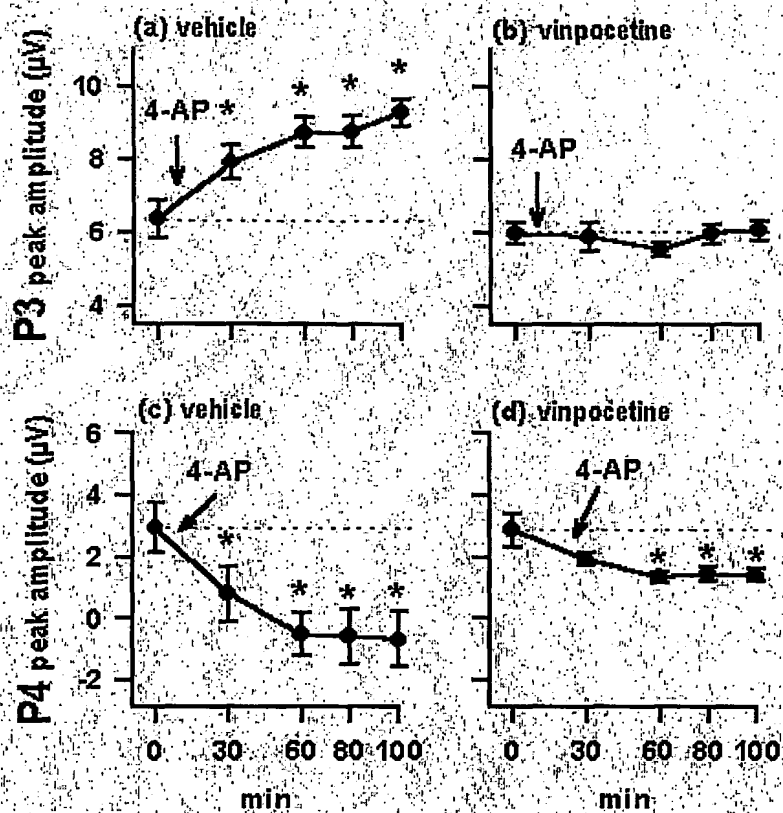
4/7

Figure 4



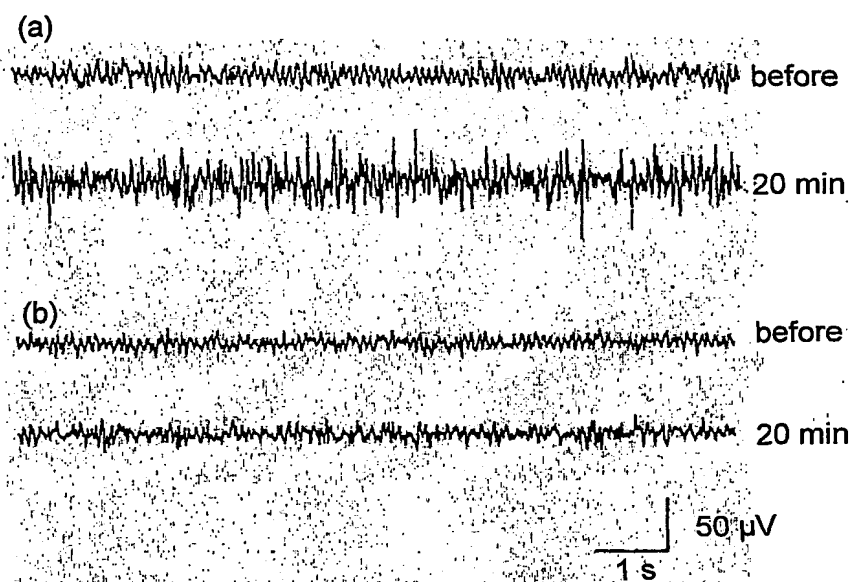
5/7

Figure 5



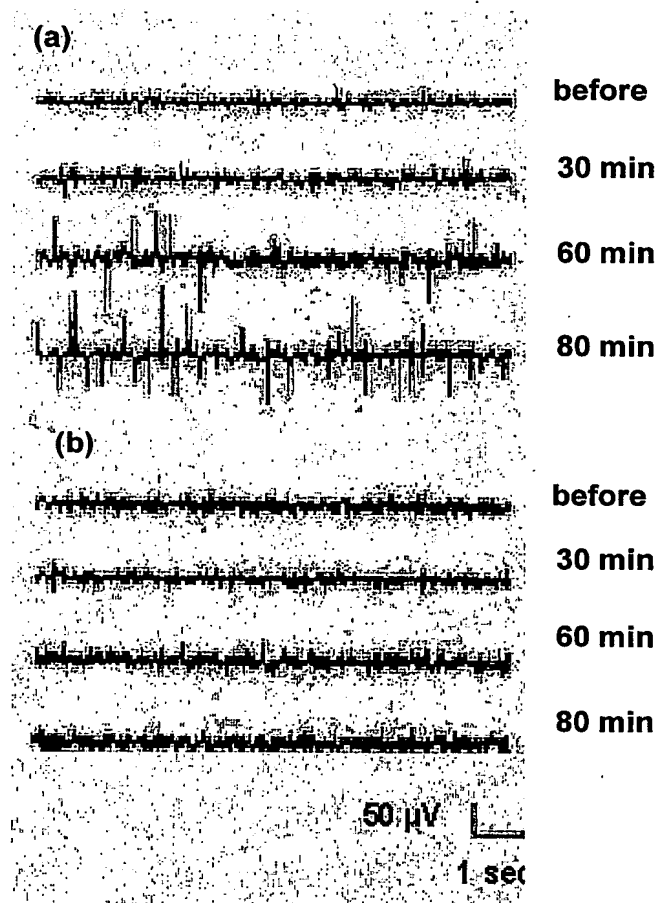
6/7

Figure 6



7/7

Figure 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/MX03/00089

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A01N 43/42; A61K 31/44
US CL : 514/283

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 514/283

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NEKRASOV, V. et al. Vinpocetine protects form aminoglycoside antibiotic-induced hearing loss in guinea pig in vivo Brain Research Vol 868 2000 pages 222-229	1, 2, 3, 5, 6
Y		4
Y	US 5,965,568 (KAKIHANA et al) 12 October 1999 (12.10.1999).	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 March 2005 (18.03.2005)

Date of mailing of the international search report

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner of Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

Konstantina Katcheves

Telephone No. (703) 305-3388

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/MX03/00089

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
SEARCH: STN, EAST, CAPLUS
hearing loss, hearing disorder, vinpocetine, registry number

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/MX03/00089¹¹

A. CLASIFICACION DE LA INVENCION

CIP7 A01N 43/42; A61K 31/44

Según la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la clasificación nacional y la IPC

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP7 U.S. : 514/283

Otra documentación consultada además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X — Y	NEKRASOV, V. et al. Vinpocetine protects form aminoglycoside antibiotic-induced hearing loss in guinea pig in vivo Brain Research Vol 868 2000 paginas 222-229	1, 2, 3, 5, 6 — 4
Y	US 5,965,568 (KAKIHANA et al) 12 de Octubre 1999 (12.10.1999)	1-6

☐ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales.☐ Véase el Anexo de la familia de patentes.

- * Categorías especiales de documentos citados:
- "A" documento que define el estado general de la técnica que no se considera como particularmente pertinente
- "E" documento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- "L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención
- "X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente
- "Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

18 de Marzo 2005 (18.03.2005)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

25 JUL 2005

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M

Funcionario autorizado

Facsímil N°

Teléfono N°

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/MX03/00089⁴

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
SEARCH: STN, EAST, CAPLUS
hearing loss, hearing disorder, vinpocetine, registry number

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.